

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 35/78, 31/195, 31/495</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/28813</b> <b>(43) Date de publication internationale: 14 août 1997 (14.08.97)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00207</b> <b>(22) Date de dépôt international: 3 février 1997 (03.02.97)</b> <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/01389      6 février 1996 (06.02.96)      FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT MALGACHE DE RECHERCHES APPLIQUEES [MG/MG]; Avarabohitra Itaosy, Boîte postale 38 33, Antananarivo 101 (MG). RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> RAKOTO RATSIMAMANGA, Albert [MG/MG]; Institut Malgache de Recherches Appliquées, Avarabohitra Itaosy, Antananarivo 101 (MG). RAKOTO RATSIMAMANGA, Suzanne [MG/MG]; Institut Malgache de Recherches Appliquées, Avarabohitra Itaosy, Antananarivo 101 (MG). RASOANAIVO, Philippe [MG/MG]; Logement 20, Résidence de Manakambahiny, Antananarivo 101 (MG). LEBOUL, Jean [FR/FR]; 24, domaine de Montvoisin, F-91400 Gometz-la-Ville (FR). PROVOST, Jean [FR/FR]; 35, rue Jean-Colin, F-37260 Monts (FR). REISDORF,		<b>Daniel [FR/FR]; 39, avenue de la République, F-94320 Thiais (FR).</b> <b>(74) Mandataire: MORVAN, Michèle; Rhône Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</b> <b>(81) Etats désignés:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title: MIXTURES DERIVED FROM GRAINS OF EUGENIA JAMBOLANA LAMARCK, PREPARATION AND USE OF SAID MIXTURES AND SOME OF THEIR CONSTITUENTS AS MEDICAMENTS</b> <b>(54) Titre: MELANGES ISOLABLES A PARTIR DE GRAINES D'EUGENIA JAMBOLANA LAMARCK, LEUR PREPARATION ET L'UTILISATION DE CES MELANGES ET CERTAINS DE LEURS CONSTITUANTS COMME MEDICAMENTS</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to mixtures which can be isolated from grains of Eugenia Jambolana Lamarck, the preparation of such mixtures, the medicaments containing said mixtures or constituents of said mixtures, and the use of these mixtures and constituents for the preparation of a medicament.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne des mélanges isolables à partir de graines d'Eugénia Jambolana Lamarck, leur préparation, les médicaments contenant ces mélanges ou des constituants de ces mélanges et l'utilisation de ces mélanges et constituants pour la préparation d'un médicament.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Oéorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**MELANGES ISOLABLES A PARTIR DE GRAINES D'EUGENIA  
JAMBOLANA LAMARCK. LEUR PREPARATION ET L'UTILISATION DE  
CES MELANGES ET CERTAINS DE LEURS CONSTITUANTS COMME  
MEDICAMENTS**

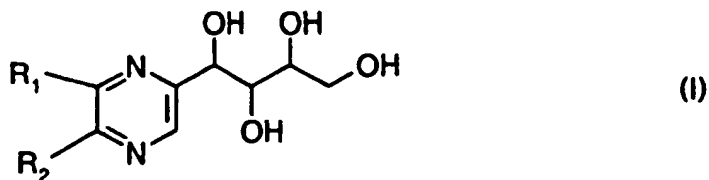
5 La présente invention concerne des mélanges isolables à partir de graines d'Eugénia Jambolana Lamarck (famille des Myrtacées), les médicaments contenant ces mélanges ou certains de leurs constituants, l'utilisation de ces mélanges et constituants pour la préparation d'un médicament antidiabétique et leur préparation.

10 Un extrait végétal préparé à partir de graines ou d'écorces d'Eugénia Jambolana contenant un complexe mixte polyphénolique et stérolique est décrit dans le brevet FR 2465484.

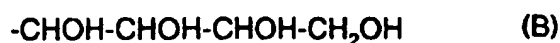
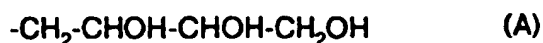
Il a maintenant été trouvé de nouveaux mélanges isolables à partir de graines d'Eugénia Jambolana Lamarck, exempts de complexe polyphénolique et stérolique, ainsi que certains constituants de ces mélanges  
15 doués de propriétés hypoglycémiantes.

Ces mélanges sont caractérisés en ce qu'ils sont exempts de dérivés polyphénoliques et stéroliques et sont isolables par broyage de graines d'Eugénia Jambolana Lamarck, macération de la poudre avec un alcool  
20 aliphatique inférieur à chaud, filtration, récupération de la partie insoluble ne contenant plus de composés polyphénoliques et stéroliques, traitement de la partie insoluble avec une solution ammoniacale, traitement du mélange ammoniacal avec un alcool aliphatique inférieur à chaud, filtration, récupération de l'insoluble et séchage de cet insoluble qui constitue le  
25 mélange I, puis éventuellement traitement du mélange I avec une solution eau-alcool aliphatique inférieur, filtration, concentration partielle du filtrat, purification sur résines adsorbantes non polaires, concentration partielle, centrifugation, ultrafiltration et isolement du mélange II.

Du mélange II peuvent également être séparés l'oxamate de sodium et les  
30 composés de formule :



dans laquelle soit  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente une chaîne de formule :



- 5 soit  $R_1$  représente une chaîne de formule (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène.

L'oxamate de sodium est déjà décrit par TOUSSAINT, Ann., 120, 237 (1861).

- Les composés de formule (I) sont déjà décrits par KUHN et coll., Ann., 644, 122-127 (1961); TSUCHIDA et coll., Agr. Biol. Chem., 39 (5), 1143-1148  
 10 (1975); TSUCHIDA et coll., Agr. Biol. Chem., 40 (5), 921-925 (1976); TSUCHIDA et coll., Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37, 154-161 (1990) et AVALOS et coll., tetrahedron, 49, 2655-2675 (1993).

- La présente invention concerne également le procédé de préparation du mélange I à partir de graines d'Eugenia Jambolana Lamarck séchées et  
 15 broyées finement.

La poudre est tamisée, de préférence, à l'aide d'un tamis normalisé de trous de 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre puis subit le traitement suivant :

- a - macération sous agitation dans un alcool aliphatique inférieur, à une température comprise entre 40 et 70°C,  
 20 b - filtration sous vide et récupération de l'insoluble,  
 c - macération sous agitation de l'insoluble avec un alcool aliphatique inférieur à une température comprise entre 40 et 70°C,  
 d - filtration sous vide et élimination des phases alcooliques contenant principalement les polyphénols et stérols indésirables,

- e - reprise de l'insoluble dans une solution ammoniacale à une température comprise entre 10 et 30°C,
- f - reprise de toute la masse humide ammoniacale dans une solution eau-alcool aliphatique inférieur, à une température comprise entre 40 et 70°C,
- 5 g - filtration et élimination de la solution alcoolique,
- h - lavage de l'insoluble avec un alcool aliphatique inférieur, filtration et élimination de la solution alcoolique,
- i - récupération de l'insoluble et séchage.

10 Dans l'étape a, on opère généralement au moyen de 2 à 10 litres d'un alcool aliphatique inférieur tel que le méthanol ou l'éthanol pour 1 kg de poudre tamisée. De préférence, on utilise 5 litres d'éthanol de titre 93-95°Gay Lussac à 60°C pendant 1 heure.

La filtration de l'étape b s'effectue de préférence sous un vide de 40kPa.

15 Dans l'étape c, on opère généralement au moyen de 2 à 10 litres d'un alcool aliphatique inférieur tel que le méthanol ou l'éthanol pour 1 kg de poudre tamisée de départ. De préférence, on utilise 4 litres d'éthanol de titre 93-95°Gay Lussac à une température de 60°C pendant 1 heure.

La filtration de l'étape d s'effectue de préférence sous un vide de 40 kPa.

20 Dans l'étape e, pour 1 kg de poudre tamisée de départ, on utilise généralement 750 à 1250 ml d'une solution aqueuse ammoniacale contenant de préférence 350 ml d'ammoniaque à 28% pour 1000 ml. Il est particulièrement avantageux d'utiliser 1 litre de la solution aqueuse ammoniacale et d'opérer pendant 10 à 30 heures et, de préférence, 20 heures à une température voisine de 20°C.

25 Dans l'étape f, la masse humide ammoniacale obtenue à partir de 1 kg de poudre tamisée de départ est généralement reprise, sous agitation, dans 2 à 10 litres d'un mélange alcool aliphatique inférieur-eau (méthanol ou éthanol par exemple) (70/30 à 80/20 en volumes) et, de préférence, dans 5 litres d'un mélange éthanol-eau (75/25 en volumes), à 60°C, pendant 1 heure.

30 Dans l'étape g, la filtration s'effectue de préférence sur une toile de coton et sous un vide d'environ 80 kPa.

Dans l'étape h, le lavage s'effectue généralement avec 500 à 1500 ml d'un alcool aliphatique inférieur (méthanol ou éthanol par exemple) pour 1 kg de poudre tamisée de départ et, de préférence, avec 1 litre d'éthanol et la filtration est réalisée sur toile de coton et sous un vide d'environ 80 kPa.

- 5 Dans l'étape i, le séchage s'effectue de préférence à l'air libre et à l'abri de la lumière.

La présente invention concerne également le procédé de préparation du mélange II.

Le mélange I obtenu précédemment est soumis aux opérations suivantes :

- 10 j - traitement du mélange I au moyen d'une solution eau-alcool aliphatique inférieur,  
k - décantation puis, d'une part, soutirage de la phase supérieure qui est filtrée pour conduire au filtrat 1 et, d'autre part, traitement de la phase inférieure avec de l'eau et filtration pour conduire au filtrat 2, rassemblement des  
15 filtrats 1 et 2 et concentration à phase aqueuse,  
l - traitement avec une résine adsorbante non polaire puis filtration,  
m - concentration du filtrat, filtration puis ultrafiltration,  
n - lyophilisation et isolement de l'extrait II.

- 20 Dans l'étape j, on utilise généralement 10 à 25 litres de la solution eau-alcool aliphatique inférieur (méthanol ou éthanol par exemple) (95/5 à 90/10 en volumes) pour 1 kg du mélange I. Il est préférable d'opérer dans 18 litres d'une solution eau-éthanol (17,7-0,93 en volumes).

- 25 Dans l'étape k, il est préférable de filtrer la phase supérieure sur toile de coton. Il est avantageux d'ajouter, pour 1 kg du mélange I, 10 à 25 litres d'eau à la phase inférieure et en particulier 10 litres et de filtrer sur fritté.

Dans l'étape k, la concentration s'effectue généralement dans un concentrateur thermosiphon à une température de 35°C sous un vide de 0,4 kPa.

Dans l'étape l, on utilise de préférence la résine S861 ou des résines de type XAD commercialisées par Rhom et Hass et on filtre sur fritté.

Dans l'étape m, la concentration s'effectue généralement dans un concentrateur thermosiphon à une température de 35°C sous un vide de 0,4 kPa. Il est également avantageux d'effectuer 3 ultrafiltrations successives sur cartouche 10 kd, 3 kd et 1 kd.

- 5 La présente invention concerne également le procédé de préparation de l'oxamate de sodium et des composés de formule (I).

Celui-ci consiste à soumettre le mélange II aux opérations suivantes :

- o - chromatographie du mélange II sur colonne de terre d'infusoire, récupération des fractions contenant les 4 produits et rassemblement de ces  
10 fractions en une seule fraction,

- p - chromatographie de la fraction précédemment obtenue sur colonne  $R_{\text{sephadex}}$  pour obtenir l'oxamate de sodium, le composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente un reste (B) et un mélange du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un atome  
15 d'hydrogène et  $R_2$  représente un reste (A) et du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un reste (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène,

- q - éventuellement chromatographie du mélange du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente un reste (A) et du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un reste (A) et  $R_2$   
20 représente un atome d'hydrogène par HPLC.

- La chromatographie de l'étape o s'effectue au moyen d'un solvant organique comme l'heptane, l'acétate d'éthyle ou un alcool aliphatique inférieur. De préférence, on utilise une colonne  $R_{\text{CHEM ELUT}}$  commercialisée par Prolabo saturée d'eau puis éluée successivement par de l'heptane, un mélange  
25 heptane-acétate d'éthyle (50/50 en volumes), de l'acétate d'éthyle, un mélange acétate d'éthyle-n-butanol (95/5; 90/10; 80/20; 50/50; 20/80, du n-butanol, et un mélange n-butanol-eau (98/2 puis 95/5 en volumes).

La chromatographie de l'étape p s'effectue de préférence au moyen d'un mélange eau-éthanol (50/50 en volumes).



La chromatographie de l'étape q s'effectue généralement sur colonne YMC 180DS-AQ commercialisée par AIT avec comme éluant un mélange eau à 0,1% d'acide formique.

5 Dans les définitions précédentes et celles qui suivent, les alcools aliphatiques inférieurs contiennent de préférence 1 à 4 atomes de carbone.

Les médicaments contenant les mélanges I ou II ou l'oxamate de sodium ou un ou plusieurs composés de formule (I) font également partie de l'invention.

10 La présente invention concerne également l'utilisation des mélanges I et II, de l'oxamate de sodium et des composés de formule (I) ou un mélange de ceux-ci à la préparation de médicaments pour le traitement ou la prévention du diabète et des complications du diabète.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

#### EXEMPLE 1 : préparation du mélange I

15 Des graines d'Eugénia Jambolana Lamarck sont séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière puis broyées finement. La poudre ainsi obtenue est tamisée à l'aide d'un tamis de maille 0,5 µm. 1 kg de poudre tamisée est mis à macérer sous agitation mécanique dans 5 litres d'éthanol de titre 93-95°Gay Lussac pendant une heure à 60°C. Après filtration sous vide, l'insoluble est traité de nouveau dans les mêmes conditions avec 4 litres d'éthanol de même titre à 20 60°C pendant encore une heure. Les deux extraits éthanoliques contenant principalement le complexe polyphénolique et stérolique indésirable sont éliminés. Après filtration complète, l'insoluble est repris avec 1 litre de solution ammoniacale (NH<sub>4</sub>OH à 28 % 350 ml et H<sub>2</sub>O distillée en quantité suffisante pour obtenir 1 litre de solution) et le mélange est laissé en contact 25 pendant environ 20 heures à une température voisine de 20°C. La masse humide ammoniacale est remise à macérer dans 5 litres du mélange éthanol de titre 93 à 95°Gay Lussac-eau (75/25 en volumes), sous agitation mécanique pendant 1 heure à 60°C. On filtre l'insoluble et on le lave avec 1 litre d'éthanol de même titre; le filtrat et le lavage sont éliminés. L'insoluble 30 final est séché à l'air libre et à l'abri de la lumière. On obtient ainsi le mélange

I sous forme de poudre exempt de dérivés polyphénoliques et stéroliques. Le rendement à partir des graines pulvérisées et tamisées est de 80 %.

#### EXEMPLE 2 - Préparation du mélange II

On agite pendant 3 heures, 1 kg du mélange I obtenu dans l'exemple 1, dans  
5 une solution contenant 17,7 litres d'eau et 0,93 litre d'éthanol. Après  
décantation une nuit, d'une part, la phase supérieure (13,5 litres) est soutirée  
puis filtrée sur toile de coton dans un filtre de 7 litres (Schott) pour donner le  
filtrat 1 (13,5 litres) et, d'autre part, la phase inférieure est agitée 1 heure  
avec 20 litres d'eau, filtrée sur fritté N°3 pour donner le filtrat 2 (24 litres). Les  
10 filtrats 1 et 2 sont rassemblés puis concentrés à phase aqueuse (33,5 litres)  
dans un concentrateur thermosiphon (Schott) à 35°C sous vide de 0,4 kPa. Le  
concentrat est agité une heure avec 2,5 litres de résine S861 (Rhom et Haas)  
puis filtré sur fritté N°3. Le filtrat est concentré dans un concentrateur ther-  
mosiphon (Schott) à 35°C sous un vide de 0,4 kPa à 5,5 litres. Le concentrat  
15 est centrifugé sur centrifugeuse tubulaire (force centrifuge 62000g), filtré sur  
filtre 0,22µm (Gelman type suporcap 100) pompe. Après 3 ultrafiltrations  
successives sur cartouche 10 Kd, 3K d et 1 Kd et lyophilisation, on obtient  
25 g du mélange II sous forme d'une poudre hygroscopique brun foncé.

#### EXEMPLE 3 - Constituants obtenus à partir du mélange II

20 525 mg du mélange II obtenu dans l'exemple 2 en solution dans 1,1 ml d'eau  
filtrée milli Q sont chromatographiés sur une colonne de <sup>R</sup>CHEM ELUT com-  
mercialisée par PROLABO de 50 cm de hauteur et d'un diamètre de 1 cm  
saturée par de l'eau filtrée milli Q. L'élution est réalisée par de l'heptane avec  
des gradients croissants en acétate d'éthyle puis en n-butanol, en  
25 n-butanol/acide chlorhydrique et en eau (fraction 1 : heptane; fraction  
2 : heptane/acétate d'éthyle (50/50 en volumes); fractions 3-4 : acétate  
d'éthyle; fractions 5-6 : acétate d'éthyle/n-butanol (95/5 en volumes),  
fractions 7-8 : acétate d'éthyle/n-butanol (90/10 en volumes), fractions 9-10 :  
acétate d'éthyle/n-butanol (80/20 en volumes); fractions 11-12 : acétate  
30 d'éthyle/n-butanol (50/50 en volumes), fractions 13-14 : acétate d'éthyle/n-  
butanol (20/80 en volumes), fractions 15-16 : n-butanol, fractions 17-  
18 : n-butanol/eau (98/2 en volumes), fractions 19-21 : n-butanol/eau (95/5  
en volumes. Des fractions de 50 ml sont recueillies. Les fractions 19 à 21

sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite. On obtient ainsi 108 mg d'une fraction qui est chromatographiée sur une colonne de R<sub>s</sub>ephadex LH20 commercialisée par Pharmacia (hauteur 100cm, diamètre 1 cm) réalisée avec un mélange méthanol-eau (50-50 en volumes). L'élution est effectuée par le même mélange éluant; des fractions de 1 ml sont collectées.

1 - Les fractions 88 à 91 sont réunies et concentrées à sec. On obtient 14,4 mg d'un produit qui donne par cristallisation dans 0,5 ml d'éthanol 2mg de 2,5-di-(tétrahydroxybutyl)pyrazine sous forme de cristaux blancs dont les caractéristiques sont les suivantes :

-pouvoir rotatoire  $[\alpha]_{20}$  (Na 589) = - 137° ± 2,0 (diméthylsulfoxyde; c=0,5),

-spectre infra-rouge réalisé sur un appareil Nicolet 60SX-R en solution dans le KBr, principales bandes d'absorption caractéristiques : 3281 cm<sup>-1</sup> (ν OH liés dont H<sub>2</sub>O), 2972+2940+2901+2880 cm<sup>-1</sup> (ν CH des CH<sub>2</sub> et CHOH), 2733 cm<sup>-1</sup> (ν OH liés), 1635cm<sup>-1</sup> (déformations des OH, dont H<sub>2</sub>O), 1491cm<sup>-1</sup> (ν C=C et C=N du noyau pyrazine), 1449 cm<sup>-1</sup> (ν C=C et C=N du noyau pyrazine + dé-formations des OH), 1413 cm<sup>-1</sup> (déformations des OH), 1343 cm<sup>-1</sup> (ν C=C et C=N du noyau pyrazine), 1309+1290+1251+1215+1181+1161+1123 cm<sup>-1</sup> (déformations des CH), 1092 cm<sup>-1</sup> (ν CO des alcools secondaires), 1048+1035 cm<sup>-1</sup> (ν CO des alcools primaires + noyau pyrazine), 947+899+854 cm<sup>-1</sup> (alcools secondaires), 877 cm<sup>-1</sup> (νCH du noyau pyrazine), 727 cm<sup>-1</sup> (noyau pyrazine + déformations des OH), 639 cm<sup>-1</sup> (noyau pyrazine), 607+531cm<sup>-1</sup> larges (déformations des OH), 451+411 cm<sup>-1</sup> (noyau pyrazine),

-spectre de masse réalisé sur un appareil FINNIGAN TSQ46, mode d'ionisation masse M/z=321 (MH)<sup>+</sup>,

-spectre de R.M.N.1H (600 MHz, DMSO, déplacement chimique en ppm) : 3,40 et 3,61 (2mts, 2H chacun : CH<sub>2</sub> en 4', 4"); 3,58 (2 mts, 2H chacun : CH en 2', 2", 3', 3"); 4,36 (t large, 2H : OH en 4', 4"); 4,40 (d, J=7,2 Hz, 2H : OH en 2', 2"); 4,63 (d, J=4,8 Hz, 2H : OH en 3', 3"); 4,95 (dd J=6,0 et 0,6 Hz, 2H : CH en 1', 1"); 5,30 (d, J=6,0 Hz, 2H : OH en 1', 1"); 8,61 (s, 2H, CH en 3 et 6),

-spectre ultra violet :  $\lambda$  max = 275 nm ( $\epsilon=8260$ ); 206 nm ( $\epsilon=10220$ ) ( $c=19$  mg/ml; eau),  $\lambda$  max = 276 nm ( $\epsilon=7960$ ); 206 nm ( $\epsilon=9920$ ) ( $c=19$  mg/ml; HCl 0,1N),  $\lambda$  max = 275 nm ( $\epsilon=7690$ ); ( $c=19$  mg/ml; KOH 0,1N),

5 -HPLC sur colonne Y.M.C. 18ODS-AQ de 150x4,6 mm (lot AIT/DE940377) commercialisée par AIT, élution isocratique H<sub>2</sub>O +0,1% d'acide formique avec un débit de 1ml/mn, détection UV à 270 nm, temps de rétention : 2 mn 32 s.

10 2 - Les fractions 92 et 93 sont réunies et concentrées à sec. On obtient 9 mg d'une fraction qui donne par cristallisation dans 0,5 ml d'éthanol 1,2 mg d'oxamate de sodium présentant les mêmes caractéristiques que celles décrites par TOUSSAINT, Ann., 120, 237 (1861).

15 3 - Les fractions 94 à 97 sont réunies et concentrées à sec. On obtient 25,9 mg d'une fraction qui donne par cristallisation dans 0,5 ml d'éthanol 6,2 mg d'un mélange de 2-(tétrahydroxybutyl)-5-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine et 2-(tétrahydroxybutyl)-6-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine qui est à nouveau séparé par HPLC sur colonne Y.M.C. 18ODS-AQ de 150x4,6 mm (lot AIT/DE940377); élution isocratique H<sub>2</sub>O +0,1% d'acide formique avec un débit de 1ml/mn, détection UV à 270 nm.

20 On obtient ainsi 5,2 mg de 2-(tétrahydroxybutyl)-5-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine qui présente les caractéristiques suivantes :

-pouvoir rotatoire  $[\alpha]^{20}_{Na\ 589} = -116,3^\circ \pm 1,7$  (diméthylsulfoxyde;  $c=0,5$ ),

25 -spectre infra-rouge réalisé sur un appareil Nicolet 60SX-R en solution dans le KBr, principales bandes d'absorption caractéristiques à 3398 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  OH liés dont H<sub>2</sub>O), 2951+2922+2891 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  CH des CHOH), 2761 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  OH liés), 1636cm<sup>-1</sup> (déformations des OH, dont H<sub>2</sub>O), 1483+1463cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  C=C et C=N du noyau pyrazine), 1411 cm<sup>-1</sup> (déformation des OH), 1367+1328+1270+1227+1191 cm<sup>-1</sup> (déformations des CH), 1071 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  CO des alcools secondaires), 1041cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  CO des alcools primaires + noyau pyrazine), 943+897 cm<sup>-1</sup> (alcools secondaires), 869 cm<sup>-1</sup> ( $\nu$  CH du noyau pyrazine), 645 cm<sup>-1</sup> (CH du noyau pyrazine), 607cm<sup>-1</sup> larges (déformations des OH), 446+409 cm<sup>-1</sup> (noyau pyrazine),

30

-spectre de masse réalisé sur un appareil FINNIGAN TSQ46, mode d'ionisation masse  $M/z=305$  (MH)+,

-spectre de R.M.N.<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO, déplacement chimique en ppm) :  
2,70 et 3,04 (2 dd,  $J=9,0$  et  $15,0$  Hz et  $J=3,0$  et  $15,0$  Hz, 1H chacun : CH<sub>2</sub> en 1"); entre 3,30 et 3,45 (mts, CH en 3", 4', 4"); entre 3,53 et 3,65 (mts, 4H : CH en 2',3',4',4"), 3,73 (mt, 1H : CH en 2"); 4,37 (t large, 1H : OH en 4"); 4,42 (mt, 2H : OH en 2' et 4"); 4,60 (d,  $J=6$  Hz, 1H : OH en 2"); 4,63 (d,  $J=6$  Hz, 1H : OH en 3"); 4,67 (d,  $J=6$  Hz, 1H : OH en 3"); 4,92 (dd  $J=6,0$  et  $0,6$  Hz, 1H : CH en 1"); 5,30 (d,  $J=6,0$  Hz, 1H : OH en 1"); 8,39 (s, 1H : CH en 6); 8,61 (s, 1H : CH en 3),

-spectre ultra violet :  $\lambda$  max = 276 nm ( $\epsilon=7756$ ) ; 206 nm ( $\epsilon=8738$ ) (c=19 mg/ml; eau),  $\lambda$  max = 277 nm ( $\epsilon=7218$ ); 208 nm ( $\epsilon=7171$ ) (c=19 mg/ml; HCl 0,1N),  $\lambda$  max = 276 nm ( $\epsilon=7467$ ) (c=19 mg/ml; KOH 0,1N),

-HPLC sur colonne Y.M.C. 18ODS-AQ de 150x4,6 mm (lot AIT/DE940377) commercialisée par AIT, élution isocratique H<sub>2</sub>O + 0,1% d'acide formique avec un débit de 1ml/mn, détection UV à 270 nm, temps de rétention : 3mn 75 s

et 1 mg de 2-(tétrahydroxybutyl)-6-(2',3',4'-trihydroxybutyl)pyrazine qui présente les caractéristiques suivantes :

-spectre de R.M.N.<sup>1</sup>H (600 MHz, DMSO, déplacement chimique en ppm) :  
2,70 et 3,04 (2 dd,  $J=9,0$  et  $15,0$  Hz et  $J=3,0$  et  $15,0$  Hz, 1H chacun : CH<sub>2</sub> en 1"); entre 3,30 et 3,45 (mts, CH en 3", 4', 4"); entre 3,53 et 3,65 (mts, 4H : CH en 2',3',4',4"), 3,73 (mt, 1H : CH en 2"); 4,37 (t large, 1H : OH en 4"); 4,42 (mt, 2H : OH en 2' et 4"); 4,60 (d,  $J=6$  Hz, 1H : OH en 2"); 4,63 (d,  $J=6$  Hz, 1H : OH en 3"); 4,67 (d,  $J=6$  Hz, 1H : OH en 3"); 4,92 (dd  $J=6,0$  et  $0,6$  Hz, 1H : CH en 1"); 5,30 (d,  $J=6,0$  Hz : 1H, OH en 1"); 8,31 (s, 1H : CH en 5); 8,53 (s, 1H : CH en 3),

-HPLC sur colonne Y.M.C. 18ODS-AQ de 150x4.6 mm (lot AIT/DE940377) commercialisée par AIT, élution isocratique H<sub>2</sub>O +0,1% d'acide formique avec un débit de 1ml/mn, détection UV à 270 nm, temps de rétention : 3 mn 61 s.

L'activité hypoglycémiant des mélanges I et II, de l'oxamate de sodium et des composés de formule (I) a été déterminée chez la souris rendue diabétique par la streptozocine et chez la souris normale en hyperglycémie post-prandiale selon les protocoles suivants :

5 I - Souris rendues diabétiques par la streptozotocine

- Des souris Swiss albinos pesant entre 22 et 25 g sont rendues diabétiques par la streptozotocine administrée par injection intrapéritonéale à la dose de 210 ou 265 mg/Kg de souris, diluée dans un tampon citrate à une concentration telle que chaque souris reçoive 0,2 ml de la solution au jour 1 (J1). 3 à 10 4 jours plus tard, on contrôle sur 2 à 3 souris si le diabète est installé (glycémies supérieures à 7,2 mmole/litre (130 mg pour 100 ml). On mesure alors la glycémie après un jeûne de 4 heures. Si les souris sont devenues diabétiques on les répartit en lots de 5 à 7 souris. Chacun des lots reçoit à partir de J1 et quotidiennement une dose sélectionnée de produit. 15 L'administration se fait une fois par jour et à heure fixe, par tubage gastrique et sous un volume de 0,4 ml d'eau distillée comme véhicule. On constitue deux lots de témoins :
- un lot de souris diabétiques non traitées
  - un lot de souris normales
- 20 Ces deux lots de témoins reçoivent par intubation gastrique et simultanément aux souris traitées, 0,4 ml de véhicule.
- Le traitement dure 4 jours. Le 5ème jour (J5) il n'y a pas d'administration de produit. Après un jeûne de 4 heures les glycémies finales sont mesurées.

II - Souris normales en hyperglycémie post-prandiale

- 25 Des souris Swiss albinos pesant entre 22 et 25 g sont mises en hyperglycémie post-prandiale par le protocole suivant :
- Jeûne 2 heures
  - nourriture en excès pendant 1 heure
  - Jeûne 2 heures
- 30 On mesure la glycémie à la fin des deux dernières heures de jeûne, qui constitue la glycémie au temps T0. Les souris sont alors réparties en lots homogènes en fonction des glycémies mesurées. Les produits à évaluer sont administrés sans délai par intubation gastrique dans 0,4 ml d'eau distillée. Le

lot témoin reçoit l'excipient (0,4 ml d'eau distillée). Après une heure, les glycémies finales sont mesurées qui constituent la glycémie au temps T60.

Résultats obtenus sur la glycémie de la souris rendue diabétique par la streptozotocine

PRODUITS mg/souris/jour	NOMBRE DE SOURIS	GLYCEMIE A J1 mg/100ml	GLYCEMIE A J5 mg/100ml	% inhibition
Oxamate de sodium (0,5mg)	5	153,40±11,53	89,90±13,94	-41,46
Mélange II (0,5mg)	5	270,50±58,72	117,50±17,35	-56,56
2-(tétrahydroxybutyl)-5- (2',3',4'-trihydroxybutyl) pyrazine (0,5mg)	5	304,25±99,35	164,50±95,13	-45,93
2-(tétrahydroxybutyl)-5- (2',3',4'-trihydroxybutyl) pyrazine et 2-(tétrahy- droxybutyl)-6-(2',3',4'- trihydroxybutyl)pyrazine (50/50) (0,25mg)	6	320,83±130,30	174,00±97,74	-45,77
Témoins	5	221,66± 50,17	210,33 ±20,07	-5,11

**Résultats obtenus sur la glycémie de la souris normale en hyperglycémie  
post - prandiale**

PRODUITS mg/souris/jour	NOMBRE DE SOURIS	GLYCEMIE A TO mg/100ml	GLYCEMIE A T60 mg/100ml	% inhibition
Mélange I (5mg)	5	129,50±29,06	87,60±14,16	-32,35
Oxamate de sodium (0,5mg)	15	136,46±23.69	102,93±20.95	-24,57
Mélange II (0,5mg)	15	133,93±17,50	105,60±16,91	-21,15
2,5-di(tétrahydroxybutyl) pyrazine (0,5 mg)	10	136,25 ±16,92	102,41 ±14,12	-24,83
2-(tétrahydroxybutyl)-5- (2',3',4'-trihydroxybutyl) pyrazine (0,5mg)	10	128,75±21,23	90,50 ±19,55	-29,70
2-(tétrahydroxybutyl)-5- (2',3',4'-trihydroxybutyl) pyrazine et 2-(tétrahy- droxybutyl)-6-(2',3',4'-tri- hydroxybutyl)pyrazine (50/50) (0.25mg)	5	126,60 ±17,03	100,60 ±16,88	-20,53
Témoins	10	137,83±13,99	130,50±20,23	-5,32

Les mélanges selon l'invention, l'oxamate de sodium et les composés de formule (I) présentent une faible toxicité. Leur DL50 est supérieure à 2000 mg/kg par voie orale chez la souris.

Les mélanges selon l'invention, l'oxamate de sodium et les composés de formule (I) abaissent la glycémie chez le sujet diabétique et sont donc utiles dans le traitement du diabète et les complications du diabète.



Lorsque ces produits sont utilisés en monothérapie dans le traitement du diabète, il n'y a pas de risque d'hypoglycémie. Ce sont des antidiabétiques vrais. Il semble que cet effet résulte d'une augmentation périphérique du glucose. Les produits ne stimulent pas significativement la sécrétion d'insuline  
5 mais la présence de petites quantités d'insuline est nécessaire à leur action.

Chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) spontanément diabétique en captivité les produits réduisent l'hyperglycémie, préviennent ou réduisent la cataracte et ramènent un certain degré de fécondité.

En thérapeutique humaine, ces produits sont donc utiles dans la prévention  
10 et le traitement du diabète et notamment du diabète de type II (NID diabète) ne présentant pas d'acétonurie, du diabète de l'obèse, du diabète de la cinquantaine, du diabète métabolique, du diabète du sujet âgé et du diabète léger. Ils peuvent être utilisés en complément de l'insulinothérapie (en raison de leur activité potentialisatrice de l'insuline) dans le diabète insulino dépendant où ils permettent de diminuer progressivement la dose d'insuline, le dia-  
15 bète instable, le diabète insulino-résistant, en complément des sulfamides hypoglycémisants quand ceux-ci ne déterminent pas de baisse suffisante de la glycémie. Ces produits peuvent être utilisés également dans les complications du diabète telles que les hyperlipémies, les troubles du métabolisme lipidique, les dyslipémies, l'obésité. Ils sont aussi utiles dans la  
20 prévention et le traitement des lésions d'athérosclérose et leurs complications (coronopathies, infarctus du myocarde, cardiomyopathies, évolution de ces trois complications vers l'insuffisance ventriculaire gauche, artériopathies diverses, artérites des membres inférieurs avec claudication et évolution vers les ulcères et la gangrène, insuffisance vasculaire cérébrale et  
25 ses complications, impuissance sexuelle d'origine vasculaire), la rétinopathie diabétique et de toutes ses manifestations (augmentation de la perméabilité capillaire, dilatation et thrombose capillaire, microanévrismes, shunt artérioveineux, dilatation veineuse, hémorragies ponctiformes et maculaires, exudats, oedèmes maculaires, manifestations de la rétinopathie proliférante :  
30 néovaisseaux, cicatrices de rétinopathie proliférante, hémorragies du vitré, décollement de la rétine), la cataracte diabétique, la neuropathie diabétique dans ses diverses formes (polyneuropathies périphériques et ses manifestations telles que paresthésies, hyperesthésies et douleurs,

mononeuropathies, radiculopathies, neuropathies autonomes, amyotrophies diabétiques), les manifestations du pied diabétique (ulcères des extrémités inférieures et du pied), la néphropathie diabétique dans ses deux formes diffuse et nodulaire, l'athéromatose (élévation des HDL lipoprotéines favorisant l'élimination du cholestérol à partir des plaques d'athérome, baisse des LDL lipoprotéines, baisse du rapport LDL/HDL, inhibition de l'oxydation des LDL, diminution de l'adhésivité plaquettaire), des hyperlipémies et des dyslipémies (hypercholestérolémies, hypertriglycéridémies, normalisation du taux des acides gras, normalisation de l'uricémie, normalisation des apoprotéines A et B), de la cataracte, de l'hypertension artérielle et ses conséquences.

Les médicaments selon l'invention sont constitués par un mélange selon l'invention, l'oxamate de sodium, un composé de formule (I) ou une combinaison de ces produits, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être employés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, le principe actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Les compositions stériles pour administration parentérale, peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylèneglycol, des huiles végétales, en particulier l'huile  
5 d'olive, des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle ou d'autres solvants organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en  
10 incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les  
15 capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylèneglycols.

Les compositions pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

20 Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement comprises entre 150 mg et 600 mg par jour par voie orale pour un adulte avec des doses unitaires allant de 50 mg à 200 mg de substance active.

25 D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les exemples suivants illustrent des compositions selon l'invention :

#### EXEMPLE A

30 On prépare, selon la technique habituelle, des gélules dosées à 50 mg de produit actif ayant la composition suivante :

	- Produit actif.....	50 mg
	- Cellulose.....	18 mg
	- Lactose.....	55 mg
	- Silice colloïdale.....	1 mg
5	- Carboxyméthylamidon sodique.....	10 mg
	- Talc.....	10 mg
	- Stéarate de magnésium.....	1 mg

**EXEMPLE B**

On prépare selon la technique habituelle des comprimés dosés à 50 mg de produit actif ayant la composition suivante :

10	- Produit actif .....	50 mg
	- Lactose.....	104 mg
	- Cellulose.....	40 mg
	- Polyvidone.....	10 mg
15	- Carboxyméthylamidon sodique.....	22 mg
	- Talc.....	10 mg
	- Stéarate de magnésium.....	2 mg
	- Silice colloïdale.....	2 mg
20	- Mélange d'hydroxyméthylcellulose, glycérine, oxyde de titane (72-3,5-24,5) q.s.p. 1 comprimé pelliculé terminé à	245 mg

**EXEMPLE C**

On prépare une solution injectable contenant 50 mg de produit actif ayant la composition suivante :

	- Produit actif.....	50 mg
25	- Acide benzoïque.....	80 mg
	- Alcool benzylique.....	0,06 ml
	- Benzoate de sodium.....	80 mg
	- Ethanol à 95 %.....	0,4 ml
	- Hydroxyde de sodium.....	24 mg
30	- Propylène glycol.....	1,6 ml
	- Eau.....q.s.p.	4 ml

## REVENDEICATIONS

1 - Mélanges exempts de dérivés polyphénoliques et stéroliques et isolables par broyage de graines d'Eugénia Jambolana Lamarck, macération de la poudre avec un alcool aliphatique inférieur à chaud, filtration, récupération de la partie insoluble ne contenant plus de composés polyphénoliques et stéroliques, traitement de la partie insoluble avec une solution ammoniacale, traitement du mélange ammoniacal avec un alcool aliphatique inférieur à chaud, filtration, récupération de l'insoluble et séchage de cet insoluble qui constitue le mélange I et éventuellement traitement du mélange I avec une solution eau-alcool aliphatique inférieur, filtration, concentration partielle du filtrat, purification sur résines adsorbantes non polaires, concentration partielle, centrifugation, ultrafiltration et isolement du mélange II.

2 - Procédé de préparation du mélange I selon la revendication 1 caractérisé en ce que des graines d'Eugénia Jambolana Lamarck sont séchées, broyées finement, tamisées et la poudre obtenue subit le traitement suivant :

- a - macération sous agitation dans un alcool aliphatique inférieur, à une température comprise entre 40 et 70°C,
- b - filtration sous vide et récupération de l'insoluble,
- c - macération sous agitation de l'insoluble avec un alcool aliphatique inférieur à une température comprise entre 40 et 70°C,
- d - filtration sous vide et élimination des phases alcooliques contenant principalement les polyphénols et stérols indésirables,
- e - reprise de l'insoluble dans une solution ammoniacale à une température comprise entre 10 et 30°C,
- f - reprise de toute la masse humide ammoniacale dans une solution eau-alcool aliphatique inférieur, à une température comprise entre 40 et 70°C,
- g - filtration et élimination de la solution alcoolique,
- h - lavage de l'insoluble avec un alcool aliphatique inférieur, filtration et élimination de la solution alcoolique,
- i - récupération de l'insoluble et séchage du mélange I.

3 - Procédé selon la revendication 2 pour lequel, dans l'étape a, on opère au moyen de 2 à 10 litres d'un alcool aliphatique inférieur pour 1 kg de poudre tamisée.

- 4 - Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3 pour lequel, dans l'étape a on utilise 5 litres d'éthanol de titre 93-95°Gay Lussac à 60°C pendant 1 heure.
- 5 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 4 pour lequel la filtration des étapes b et d s'effectuent sous un vide de 40 kPa.
- 6 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 5 pour lequel dans l'étape c, on opère au moyen de 2 à 10 litres d'un alcool aliphatique inférieur pour 1 kg de poudre tamisée de départ.
- 10 7 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 6 pour lequel, dans l'étape c, on utilise 4 litres d'éthanol de titre 93-95°Gay Lussac, à une température de 60°C pendant 1 heure.
- 8 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 7 pour lequel dans l'étape e, pour 1 kg de poudre tamisée de départ, on utilise 750 à 1250 ml d'une solution aqueuse ammoniacale.
- 15 9 - procédé selon l'une des revendications 2 à 8 pour lequel dans l'étape e, pour 1 kg de poudre tamisée de départ on utilise 1 litre de solution aqueuse ammoniacale contenant 35 ml d'ammoniaque à 28% et on opère à une température voisine de 20°C pendant 10 à 30 heures heures.
- 20 10 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 9 pour lequel dans l'étape f, la masse humide ammoniacale obtenue à partir de 1 kg de poudre tamisée de départ est reprise dans 2 à 10 litres d'une solution eau-alcool aliphatique inférieur.
- 25 11 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 10 pour lequel dans l'étape f on opère dans 5 litres d'un mélange éthanol-eau (75/25 en volumes), à 60°C, pendant 1 heure.
- 12 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 11 pour lequel dans l'étape h, le lavage s'effectue avec 500 à 1500 ml d'un alcool aliphatique inférieur pour 1 kg de poudre tamisée de départ.

13 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 12 pour lequel dans l'étape h le lavage s'effectue avec 1 litre d'éthanol et la filtration est réalisée sur toile de coton et sous un vide d'environ 80 kPa.

5 14 - Procédé selon l'une des revendications 2 à 12 pour lequel dans l'étape i, le séchage s'effectue à l'air libre et à l'abri de la lumière.

15 - Procédé de préparation du mélange II selon la revendication 1 pour lequel le mélange I selon la revendication 1 est soumis aux opérations suivantes :

- 10 j - traitement du mélange I selon la revendication 1 au moyen d'une solution eau-alcool aliphatique inférieur,  
k - décantation puis, d'une part, soutirage de la phase supérieure qui est filtrée pour conduire au filtrat 1 et, d'autre part, traitement de la phase inférieure avec de l'eau et filtration pour conduire au filtrat 2, rassemblement des filtrats 1 et 2 et concentration à phase aqueuse,  
15 l - traitement avec une résine adsorbante non polaire puis filtration,  
m - concentration du filtrat, filtration puis ultrafiltration,  
n - lyophilisation et isolement de l'extrait II.

20 16 - Procédé selon la revendication 15 pour lequel dans l'étape j, on utilise 10 à 25 litres de la solution eau-alcool aliphatique inférieur (95/5 à 90/10 en volumes) pour 1 kg du mélange I pour 1 kg du mélange I.

17 - Procédé selon l'une des revendications 15 ou 16 pour lequel dans l'étape j on utilise 18 litres d'une solution eau-éthanol (17,7-0,93 en volumes).

25 18 - Procédé selon l'une des revendications 15 à 17 pour lequel dans l'étape k, on filtre la phase supérieure sur toile de coton et on ajoute, pour 1 kg du mélange I, 10 à 25 litres d'eau à la phase inférieure et on filtre sur fritté.

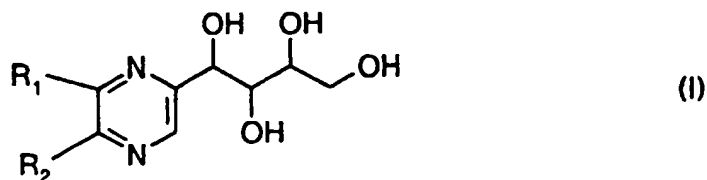
19 - Procédé selon l'une des revendications 15 à 18 pour lequel dans l'étape k, la concentration s'effectue généralement dans un concentrateur thermosiphon à une température de 35°C sous un vide de 0,4 kPa.

30 20 - Procédé selon l'une des revendications 15 à 19 pour lequel dans l'étape l, on utilise la résine S861 ou des résines de type XAD commercialisées par Rhom et Hass et on filtre sur fritté.

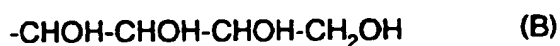
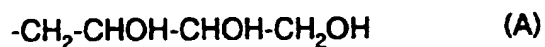
21 - Procédé selon l'une des revendications 15 à 20 pour lequel dans l'étape m, la concentration s'effectue dans un concentrateur thermosiphon à une température de 35°C sous un vide de 0,4 kPa.

22 - Procédé selon l'une des revendications 15 à 21 pour lequel dans l'étape m on effectue 3 ultrafiltrations successives sur cartouche 10 kd, 3 kd et 1 kd.

23 - Procédé de préparation de l'oxamate de sodium et des composés de formule :



dans laquelle soit  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente une chaîne de formule :



soit  $R_1$  représente une chaîne de formule (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène pour lequel le mélange II selon la revendication 1 est soumis aux opérations suivantes :

o - chromatographie du mélange II selon l'invention sur colonne de terre d'infusoire, récupération des fractions contenant les 4 produits et rassemblement de ces fractions en une seule fraction,

p - chromatographie de la fraction précédemment obtenue sur colonne  $R_{\text{sephadex}}$  pour obtenir l'oxamate de sodium, le composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente un reste (B) et un mélange du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente un reste (A) et du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un reste (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène,



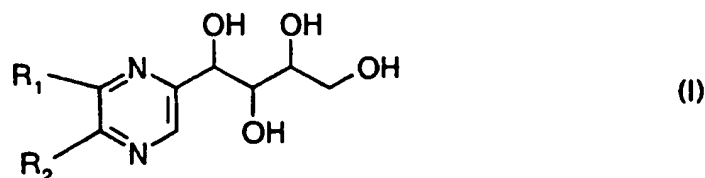
q - éventuellement chromatographie du mélange du composé de formule (II) pour lequel  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente un reste (A) et du composé de formule (I) pour lequel  $R_1$  représente un reste (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène par HPLC.

- 5 24 - Procédé selon la revendication 23 pour lequel la chromatographie de l'étape o est effectuée sur colonne de <sup>®</sup>CHEM ELUT commercialisée par Prolabo saturée d'eau puis éluée successivement par de l'heptane, un mélange heptane-acétate d'éthyle (50/50 en volumes), un mélange acétate d'éthyle-n-butanol (95/5; 90/10; 80/20; 50/50; 20/80 puis 0/100 en volumes)  
10 et un mélange n-butanol-eau (98/2 puis 95/5 en volumes)..

25 - Procédé selon la revendication 24 pour lequel la chromatographie de l'étape p s'effectue au moyen d'un mélange eau-éthanol (50/50 en volumes).

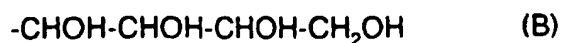
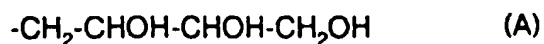
- 26 - Procédé selon la revendication 24 pour lequel la chromatographie de l'étape q s'effectue sur colonne YMC 180DS-AQ commercialisée par AIT  
15 avec comme éluant un mélange eau à 0,1% d'acide formique.

27 - Médicaments caractérisés en ce qu'ils contiennent en tant que principe actif un mélange I selon la revendication 1 ou un mélange II selon la revendication 1 ou l'oxamate de sodium ou un ou plusieurs composés de formule :



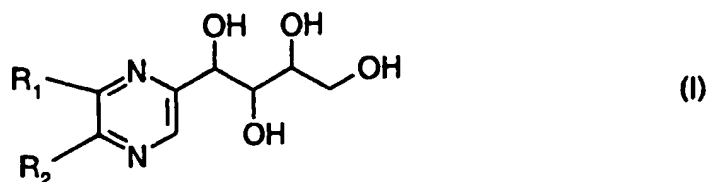
20

dans laquelle soit  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente une chaîne de formule :

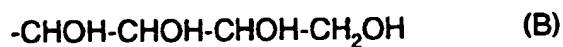
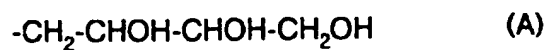


- 25 soit  $R_1$  représente une chaîne de formule (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène et un ou plusieurs excipients.

28 - Utilisation d'un mélange I selon la revendication 1 ou un mélange II selon la revendication 1 ou l'oxamate de sodium ou un ou plusieurs composés de formule :



- 5 dans laquelle soit  $R_1$  représente un atome d'hydrogène et  $R_2$  représente une chaîne de formule :



- soit  $R_1$  représente une chaîne de formule (A) et  $R_2$  représente un atome d'hydrogène pour la préparation d'un médicament pour la prévention et le
- 10 traitement du diabète et des complications du diabète.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/FR 97/00207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K35/78 A61K31/195 A61K31/495

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FR 2 465 484 A (URWERG SUZANNE) 27 March 1981 cited in the application see page 2, line 2 - page 3, line 11 ---	1,27,28
Y	DE 21 59 923 A (SCHWABE WILLMAR DR) 14 June 1973 see page 2, line 18 - page 3, line 23 ---	1,27,28
A	FR 6 114 M (LABORATOIRES LAROCHE NAVARRON) 17 June 1968 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 1997

Date of mailing of the international search report

25.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Remp, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2465484 A	27-03-81	NONE	
DE 2159923 A	14-06-73	NONE	
FR 6114 M	17-06-68	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. Je Internationale No  
PCT/FR 97/00207

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 A61K35/78 A61K31/195 A61K31/495		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FR 2 465 484 A (URWERG SUZANNE) 27 Mars 1981 cité dans la demande voir page 2, ligne 2 - page 3, ligne 11 ---	1,27,28
Y	DE 21 59 923 A (SCHWABE WILLMAR DR) 14 Juin 1973 voir page 2, ligne 18 - page 3, ligne 23 ---	1,27,28
A	FR 6 114 M (LABORATOIRES LAROCHE NAVARRON) 17 Juin 1968 -----	
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  11 Juin 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  25.06.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Rempp, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Des .e Internationale No

PCT/FR 97/00207

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2465484 A	27-03-81	AUCUN	
DE 2159923 A	14-06-73	AUCUN	
FR 6114 M	17-06-68	AUCUN	